Sukzessive Mehrfach-Immunisierung von Kaninchen mit Adenoviren*

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jantik Kho (Janto Simkoputera)

Saarbrücken

1972

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann

SUKZESSIVE MEHRFACH-IMMUNISIERUNG VON KANINCHEN MIT ADENOVIREN *

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Jantik Kho (Jento Simkoputera)
geb. am 23.05.1947 in Pekalongan, Indonesien

Dekan: Prof. Dr. med. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung
wurde am 29. März 1972 abgelegt.

Einleitung

Die serologischen Beziehungen der Adenoviren des Menschen sind äußerst komplex. Auf der einen Seite steht das allen Adenoviren der Säugetiere gemeinsame gruppenspezifische Antigen, das in der Hexonkomponente lokalisiert ist. Auf der anderen Seite gibt es strikt typenspezifische Eigenschaften. Weiterhin finden sich Beziehungen, die nur wenige Typen miteinander verbinden (Stevens et al., 1967; Wigand, 1968) solche, die innerhalb einer der 4 Untergruppen bestehen (Norrby, 1969) oder auch mehrere Untergruppen, aber nicht alle umfassen (Norrby, 1969). Schließlich muß das Phänomen der sogenannten Intermediärtypen genannt werden, wie sie namentlich in der Untergruppe II in verwirrender Vielfalt gefunden wurden (Wigand und Fliedner, 1968). Die Zuordnung aller dieser Antigen-Beziehungen zu bestimmten Strukturelementen der Viren ist wenigstens teilweise möglich geworden (Norrby, 1969; Wigand und Meiser, 1969).

Bei der Infektion des Menschen mit Adenoviren findet man eine Antikörperbildung oft auch gegen heterologe Typen, sowohl im Neutralisationstest wie in der Hämagglutinations-Hemmung (Wigand et al., 1965; Kasel et al., 1965). Diese heterologe Reaktion erstreckt sich überwiegend auf Viren innerhalb der Untergruppe, wenn auch in der Regel nicht auf alle. Dies weist auf die Existenz eines Untergruppenspezifischen Antigens hin. Ein solches konnten Norrby und Wadell (1969) mittels Absättigungsversuchen nachweisen;

ein direkter Nachweis im Versuchstier gelang bisher aber noch nicht. Die Frage der Existenz und der Eigenschaften eines solchen Antigens ist nicht nur theoretisch, sondern auch für den Infektionsschutz und eventuelle Impfprophylaxe beim Menschen interessant.

E i g e n e F r a g e n s t e l l u n g : Eine sukzessive Immunisierung von Tieren mit Adenoviren verschiedener Typen innerhalb und außerhalb einer Untergruppe sollte uns helfen, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Verhalten sich die Tiere bei Mehrfach-Immunisierung ähnlich wie der Mensch, bei dem ja auch Infektionen mit verschiedenen Typen nacheinander ablaufen und damit die Antikörperbildung beeinflussen?

2. Läßt sich auf diese Weise ein Untergruppen-spezifisches Antigen nachweisen, indem nach Mehrfach-Immunisierung eine breite, viele oder alle Typen der Untergruppe umfassende Antikörperbildung eintritt?

3. Falls dies nicht der Fall ist, lassen sich auf diese indirekte Weise bisher unbekannte serologische Beziehungen zwischen bestimmten Typen aufdecken?

4. Die Typen 20, 25 und 28 wurden bis vor kurzem wegen ihrer hämagglutinierenden Aktivität für Affenblutkörperchen und fehlender Aktivität für Rattenblutkörperchen der Untergruppe I zugeordnet. Sie sind aber als Mitglieder der Untergruppe II aufzufassen (Wigand, 1970), die Rattenblutkörperchen nicht oder nur schwach agglutinieren.

Bei der Mehrfach-Immunisierung sollte sich zeigen, ob außer den bereits bekannten weitere serologische Beziehungen zu hämagglutinierenden Typen der Untergruppe II existieren.

Material und Methoden

V i r e n . Die Prototypstämme der Untergruppe II (Typ 8, 9, 10, 13, 15, 17, 22, 23, 24, 26, 27, 29, 30) sowie der Typen 20, 25 und 28 und der neu beschriebenen Typen 33-15, 34-20 und 24-32 (Wigand und Fliedner, 1968), außerhalb der Untergruppe II die Prototypen von Typ 2, 3, 5, 7, 12 und 18 wurden in HeLa-Zellkulturen vermehrt. Titrationen und Neutralisationen nahmen wir ebenfalls in diesen Zellen vor.

I m m u n i s i e r u n g . Wir verwendeten ca. 3 kg schwere Kaninchen aus gemischter Zucht. Die Tiere wurden mit den betreffenden Viren i.v. ohne Verwendung von Adjuvantien inokuliert. Es war Wert darauf zu legen, wenigstens annähernd gleiche Antigendosen der verschiedenen Typen zu verabreichen. Als Maß für die Qualität der verwendeten Antigene diente uns der Infektiositätstiter und der Gehalt an gruppenspezifischem Antigen, bestimmt mittels Komplementbildung. Pro Injektionsdosis wurden zwischen 1200 und 4800 komplementbindende Antigen-Einheiten sowie zwischen 800 und 2400 $TCID_{50}$ gegeben. Die Infektiosität wurde in HeLa-Zellkulturen titriert mit einer Ablesung 3 Tage nach Inoculation, was bekanntlich nur einen kleinen aber vergleichbaren Bruchteil des wirklichen Titers wieder-

gibt. Bei Virustypen mit geringem Titer wurde das Antigen in 2 Dosen aufgeteilt und an 2 aufeinanderfolgenden Tagen injiziert.

Allen Tieren wurde zunächst Typ 24 verabreicht. Diesen Typ wählten wir deswegen, weil er in beiden Testen und in beiden Richtungen stets strikt typenspezifische Eigenschaften aufweist. 37 Tage später ("2. Immunisierung") wurden je 2 Tiere erneut mit Typ 24 bzw. mit den Typen 9, 15 und 19 als Vertreter der Untergruppen III, I und IV inokuliert. Nach einer längeren Wartezeit (84 Tage nach der 2. Immunisierung) erhielten die Tiere eine weitere Injektion mit unterschiedlichen Typen gemäß Tabelle 1 ("3. Immunisierung"). Zwei Kaninchen (367, 397) waren bei der Blutentnahme inzwischen eingegangen und fielen daher für die 3. Immunisierung aus. Für diese 6 Tiere, die mit Viren außerhalb der Untergruppe II immunisiert worden waren, waren die zur 2. und 3. Immunisierung verwendeten Typen wie folgt: 2-5, 2-7, 3-7, 3-7, 12-18, 12-18. Blutentnahmen erfolgten vor Beginn der Immunisierung: 15 Tage nach der ersten Immunisierung, 2 Tage vor der 2. Immunisierung und je 15 Tage nach der 2. und 3. Immunisierung. Die Seren wurden nicht inaktiviert.

S e r o l o g i s c h e T e s t e . Zur Hämagglutinations-Hemmung (HA-Hemmung) wurden die Seren zur Entfernung unspezifischer Hämagglutinine 2 mal mit Rattenblutkörperchen absorbiert. Der Test wurde mit einer initialen Serumverdünnung von 1:20 unter Verwendung von 4

hämagglutinierenden Einheiten Antigen und Rattenblutkörperchen durchgeführt. Für qualitative Neutralisationsteste wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:5, für quantitative Zwecke in Verdünnungsstufen mit dem Faktor 4 getestet. Nach dem Verfahren von Rowe et al. (1958) diente die Hemmung des cytopathischen Effektes als Kriterium für die Neutralisation.

U m f a n g d e r T e s t e ; B e w e r t u n g .
Zum Nachweis heterologer HA-hemmender Antikörper wurden alle Rattenblutkörperchen agglutinierenden Typen der Untergruppe II unter Einschluß von Typ 33-15 und 34-20 als Antigen mit sämtlichen Immunseren nach der 2. und 3. Immunisierung getestet. Die Reaktionen bewerteten wir als positiv, wenn sich bei wiederholter Untersuchung Titer höher als 1:20 ergaben. Für den Vergleich zweier Seren eines Kaninchens bedeutet dies einen Titeranstieg um mindestens das 4 fache (z.B. von - 1:20 auf 1:40). Gegen Typ 24 wurden alle Immunseren quantitativ in der HA-Hemmung und Neutralisation getestet. Bei Typ 24 wurde in der HAH auch ein Titeranstieg um Faktoren 2 bewertet, wenn er bei Wiederholungsuntersuchung bestätigt wurde. Zur heterologen Neutralisation setzten wir die nach der 2. und 3. Immunisierung gewonnenen Seren gegen alle Typen der Untergruppe II unter Einschluß der nicht hämagglutinierenden Typen sowie von Typ 24-32 an. Lediglich mit Typ 8 wurden keine Neutralisationstests durchgeführt. Eine Neutralisation durch 1:5 verdünntes Serum wurde dann als positiv ange-

sehen, wenn sie bei Wiederholung reproduziert wurde und das vor Immunisierung entnommene Serum keine Antikörper gegen den betreffenden Typ zeigte. Die Virustypen außerhalb der Untergruppe II wurden in der Neutralisation nur mit ihren homologen Seren, in der HA- Hemmung überhaupt nicht getestet.

Ergebnisse

Homologe Reaktionen

Homologe HA-hemmende Antikörper fanden sich bei allen Tieren, die mit hämagglutinierenden Viren der Untergruppe II immunisiert worden waren; die Titer lagen zwischen 1:80 und 1:640. Neutralisierende Antikörper gegen den homologen Virustyp ließen sich bei der Mehrzahl der Tiere nachweisen. Allerdings zeigten nach der 2. Immunisierung 2 der 3 mit Typ 25 (369, 378) und je 1 mit Typ 20 (395) und Typ 18 (398) inokuliertes Tier keine homologen neutralisierenden Antikörper.

Reaktionen mit Typ 24

HA-hemmende Antikörper gegen Typ 24 lagen vor Beginn der 2. Immunisierung, also 35 Tage nach der ersten, bei allen Tieren vor, und zwar in Titern zwischen 1:80 und 1:640. Ein Titeranstieg nach der 2. Immunisierung fand sich erwartungsgemäß bei den beiden mit Typ 24 nachimmunisierten Tieren, außerdem noch bei 4 der 13 Tiere, die mit Viren der Untergruppe

II nachimmunisiert worden waren, aber bei keinem der Tiere, die Typen außerhalb der Untergruppe II erhalten hatten (s. Tab. 5). Nach der 3. Immunisierung fand sich bei keinem der Tiere ein Titeranstieg; jedoch ist dieser negative Befund insofern unsicher, als unmittelbar vor der 3. Immunisierung keine erneute Blutentnahme vorgenommen wurde. So ist ein zwischenzeitliches Absinken und erneutes Ansteigen des Antikörpertiters möglicherweise unserer Beobachtung entgangen.

Alle Tiere wiesen nach der ersten Immunisierung neutralisierende Antikörper gegen Typ 24 auf mit Titern zwischen 1:20 und 1:80. Ein Titeranstieg nach der 2. Immunisierung fand sich nur bei den beiden Tieren, die zum 2. Mal Typ 24 erhielten. Nach der 3. Immunisierung ließ sich kein Antikörperanstieg nachweisen, was mit der gleichen Einschränkung wie bei der HA-Hemmung zu bewerten ist. Die beiden mit Typ 24 inokulierten Tiere zeigten in beiden Testen ausschließlich homologe Reaktionen.

Heterologe Hämagglutinations-Hemmung

Zur Beurteilung heterologer Reaktionen sei zunächst abgesehen von denjenigen, die auf Grund serologischer Verwandtschaft einzelner Typen der Untergruppe II zu erwarten sind. Allgemein ist festzustellen, daß eine breit übergreifende Antikörperbildung gegen eine Vielzahl von Typen der Untergruppe II bei keinem der Tiere eintrat. Immerhin fan-

den sich in der HA-Hemmung nach der 2. Immunisierung in 5, nach der 3. in 15 Fällen eine Kreuzreaktion mit dem einen oder anderen heterologen Typ (Tab. 1, 3, 5). Dies geschah ausschließlich bei Tieren, die mit den hämagglutinierenden oder nicht hämagglutinierenden Typen der Untergruppe II immunisiert worden waren. Keines der Tiere, denen man Viren außerhalb der Untergruppe II appliziert hatte, zeigte eine heterologe Antikörperbildung. Die Höhe der Antikörpertiter lag zwischen 1:40 und 1:1280. Die höchste Zahl der Antikörper gegen heterologe Viren war 4 (Kaninchen 368 nach der 3. Immunisierung). Von den 6 Tieren, bei denen in der 2. Immunisierung ein hämagglutinierender Typ der Untergruppe II gegeben worden war, zeigten 3 (368, 302, 400) nach der 3. Immunisierung mit einem anderen Typ einen Antikörperanstieg gegen den bei der 2. Immunisierung verwendeten (Typ 9 bzw. 15). Vergleicht man die zur Immunisierung verwendeten Typen mit denjenigen, gegen welche die Antikörper gerichtet sind, so ist es auffällig, daß nach Immunisierung mit Typ 20 in 4 von 7 möglichen Fällen HA-hemmende Antikörper gegen Typ 13 auftraten. Keine heterologen Antikörper wurden gegen die Typen 17, 19, 22, 26, 29 und 30, relativ häufig dagegen solche gegen die Typen 10 und 13 gefunden.

Heterologe Neutralisation

Nach der 2. Immunisierung zeigte sich in 7, nach der 3. in 5 Fällen eine heterologe Neutralisation (Tab. 1, 4), wiederum ausschließlich bei den Tieren, die mit Viren der Unter-

gruppe II inokuliert worden waren. Von den 6 Tieren mit fehlender homologer Neutralisation (s.o.) zeigten 2 (378, 395) nichtsdestoweniger eine Antikörperbildung gegen ein heterologes Virus. Die 12 Reaktionen richten sich gegen 7 verschiedene Typen. Bemerkenswerterweise zeigte sich in keinem einzigen Fall eine gleichlaufende heterologe Antikörperbildung gegen einen Typ in Neutralisation und HA-Hemmung.

Auftreten von Kreuzreaktionen, die auf Grund serologischer Verwandtschaft zu erwarten sind

In der HA-Hemmung sind die Typen 8 und 9 identisch. Bei unseren Seren wurden ebenfalls in allen Fällen übereinstimmende Ergebnisse erzielt, so daß in den Tab. 1 und 2 der Typ 8 unberücksichtigt blieb. Bekanntlich finden sich weitere reziproke Reaktionen zwischen den Typen 10 und 19 sowie 15 und 22 (Wigand, 1968). Die beiden mit Typ 19 immunisierten Tiere zeigten auch gegen Typ 10 HA-hemmende Antikörper; jedoch reagierten die 5 Kaninchen, die nach der 2. Immunisierung Antikörper gegen Typ 10 entwickelten, mit Typ 19 sämtlich negativ. Von den beiden mit Typ 15 inokulierten Tieren zeigte eins (400) eine Kreuzreaktion mit Typ 22.

Schwache Reaktionen fanden wir früher mit Typ 28-Seren gegen Typ 27-Virus und mit Typ 25-Seren gegen Typ 29- Virus (Wigand, 1968). Demgegenüber zeigten unsere mit Typ 28 in-

okulierten Tiere keine Reaktion mit Typ 27, was wohl durch die schwache Antikörperbildung auch gegen den homologen Typ 28 zu erklären ist. Von den 5 mit Typ 25 inokulierten Tieren reagierten 3 mit Typ 29, was die Bedeutung dieser Beziehung unterstreicht.

In der Neutralisation finden sich weitreichende Kreuzreaktionen zwischen den Typen 15 und 25 sowie 15 und 29, während Typ 25 und 29 nicht miteinander kreuzen (Stevens et al., 1967; Wigand und Fliedner, 1968). Eine Kreuzneutralisation war bei unseren Tieren in einigen Fällen, aber keineswegs regelmäßig vorhanden (Tab. 6). Die komplexe Beziehung dieser 3 Typen wird durch diese Befunde erneut verdeutlicht. Die übrigen von Stevens et al. (1967) oder uns (Wigand und Fliedner, 1968) gefundenen Kreuzreaktionen können außer Betracht bleiben, da die betreffenden Typen nicht zur Immunisierung verwendet wurden.

Diskussion

Die geschilderten Befunde werden in ihrer Allgemeingültigkeit dadurch eingeschränkt, daß die Antigene der verschiedenen Typen nicht in jeder Hinsicht gleich stark eingestellt werden konnten. Dies ist allenfalls möglich durch Verwendung gereinigter Viruspartikel mit gleicher Antigenmasse. Die Stärke der Antigendosis war etwa so, wie man sie üblicherweise zur Herstellung von Immunseren verwendet, wobei auch nicht immer schon nach der ersten Applikation des Antigens Antikörper nachgewiesen werden kön-

nen. In 6 Fällen hat bei unseren Tieren ein einmaliger Antigen-Stimulus nicht ausgereicht, um mit unserer Methode homologe neutralisierende Antikörper nachzuweisen, wovon jedoch immerhin 3 Tiere heterologe Antikörper bildeten. Es ist anzunehmen, daß bei der Infektion des Menschen erheblich größere Antigenmengen zur Auswirkung kommen, da sich das Virus im menschlichen Organismus vermehrt, nicht dagegen beim Versuchstier. Beim Menschen fand man nach Infektion mit Typ 26 und 27 (Untergruppe II) bei 14% der Teste heterologe Antikörperanstiege in der HA-Hemmung bei Individuen, die vor der Infektion keine Antikörper gegen den betreffenden Typ aufwiesen (Wigand et al., 1965). Diese Quote liegt zwar höher als bei unseren Kaninchen; doch wurde bei den Tierseren erst ein Titer von 1:40 als positiv bewertet, beim Menschen dagegen bereits ein solcher von 1:10.

Eine breite, auf viele oder alle Typen der Untergruppe II überkreuzende Antikörperbildung trat bei unseren Versuchstieren nicht ein; sie findet sich auch beim Menschen nicht (Wigand et al., 1965). Jedoch ist es von großem Interesse, daß sowohl in der HA-Hemmung wie in der Neutralisation heterologe Reaktionen in beträchtlicher Zahl zu beobachten waren, und zwar ausschließlich bei den Tieren, die mit hämagglutinierenden oder nicht hämagglutinierenden Typen der Untergruppe II immunisiert worden waren, in keinem Fall aber bei solchen, die Viren außerhalb der Untergruppe II erhalten haben. Daß dies nicht zufällig ist, wird dadurch verdeutlicht, daß von den 13 mit Viren der Untergruppe II immunisierten Tieren nur ein einziges keine heterologen

Antikörper gebildet hat, und dies war ein vorzeitig eingegangenes Tier, bei dem keine 3. Immunisierung durchgeführt wurde. Demgegenüber blieben alle 6 Tiere, die Viren außerhalb der Untergruppe erhielten, ohne heterologe Reaktion.

Die Vorimmunisierung durch Typ 24 dürfte bei unseren Tieren eine Konditionierung verursacht haben infolge eines Antigen-Stimulus durch determinante Gruppen, die im Antigenmosaik mehrerer Typen der Untergruppe II vorhanden sind. Dieses Antigen ist mindestens 3 Typen gemeinsam (Typ 24, dem 2. oder 3. immunisierenden Virus und dem heterolog reagierenden Typ), und diese Typen scheinen quer durch die ganze Untergruppe II zu streuen. Dies spricht dafür, daß es sich um eine Untergruppen-spezifische Determinante handelt. Daß dieses Antigen bei Hyperimmunisierung mit einem einzigen Virustyp nicht zur Auswirkung kommt, läßt sich vielleicht durch die Konkurrenz der übrigen stärker wirksamen Antigenanteile des betreffenden Virus erklären.

Wenn auch die Typen, gegen welche die heterologen Antikörper gerichtet sind, fast regellos verteilt erscheinen, so ist immerhin bemerkenswert, daß diese Reaktionen in der Neutralisation und in der HA-Hemmung in keinem Fall gegen den gleichen Typ nachzuweisen waren (Tab. 1). Dies mag damit erklärt werden, daß im Fall der heterologen Reaktion in der HA-Hemmung die Fiberkomponente, im Fall der Neutralisation die Hexonkomponente zur Wirkung gekommen ist (Norrby, 1969; Wigand und Meiser, 1969). Wiederum erfordert dies die Annahme, daß in beiden Komponenten Unter-

gruppen-spezifische Determinanten existieren. Die auffallende Häufigkeit der Bildung HA-hemmender Antikörper gegen Typ 13 nach Immunisierung mit Typ 20 läßt eine spezielle Verwandtschaft zwischen diesen beiden Typen vermuten, wobei erwähnt werden soll, daß es einen Intermediärtyp 13-20 gibt (Wigand und Fliedner, 1968). Ebenso mag die Bildung Ha-hemmender Antikörper gegen Typ 33 bei je einem Tier nach Immunisierung mit Typ 15 bzw. 25 sowie die Antikörperbildung gegen Typ 34 nach Immunisierung mit Typ 20 mit dem Vorhandensein der intermediären Typen 33-15 bzw. 34-20 in Verbindung stehen (Wigand und Fliedner, 1968), wenn auch hier ein zufälliges Zusammentreffen nicht ausgeschlossen ist. Wenn ein Zusammenhang besteht, so müßte man bei den Intermediärstämmen eine serologische Beziehung zwischen dem für die HA-Hemmung verantwortlichen Fiber- und dem für die Neutralisation verantwortlichen Hexonanteil postulieren.

Kein Zweifel besteht daran, daß sich die nicht hämagglutinierenden Typen 20, 25 und 28 auch in der vorliegenden Untersuchung ähnlich den hämagglutinierenden Typen der Untergruppe II verhielten und mindestens ebenso viele heterologe Antikörper-Anstiege wie diese hervorriefen. Dies bestätigt erneut ihre Zugehörigkeit zur Untergruppe II (Wigand, 1970), ebenso wie die kürzlich mitgeteilte Beobachtung, daß diese Typen unter bestimmten Bedingungen zur Agglutination von Rattenblutkörperchen befähigt sind (Hierholzer und Dowdle, 1970).

Zusammenfassung

Nach Grundimmunisierung von insgesamt 21 Kaninchen mit Adenovirus 24 (Untergruppe II) und 2 weiteren Immunisierungen mit hämagglutinierenden oder nicht hämagglutinierenden Adenovirustypen der Untergruppe II zeigten sich in der Hämagglutinations-Hemmung in 20, in der Neutralisation in 12 Fällen heterologe Antikörper gegen andere Typen der Untergruppe II. Eine Nachimmunisierung mit Viren außerhalb der Untergruppe II führte in keinem Fall zu einer Antikörperbildung gegen Viren der Untergruppe II. Die heterologe Antikörperbildung wird als Antwort auf ein Untergruppen-spezifisches Antigen aufgefaßt. Die heterologen Reaktionen waren in Hämagglutinations-Hemmung und Neutralisation in keinem Fall gegen den gleichen Typ gerichtet. Auffallend war eine häufige Stimulierung hämagglutinationshemmender Antikörper gegen Typ 13 nach Immunisierung mit Typ 20.

L i t e r a t u r

Hierholzer, J.C., Dowdle, W.R.: Hemagglutination properties of adenovirus types 20, 25, and 28. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 134, 482 (1970)

Kasel, J.A., Banks, P.A., Wigand, R., Knight, V. Alling, D.W.: An immunologic classification of heterotypic antibody responses to adenoviruses in man. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 119, 1162 (1965).

Norrby, E.: The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. J.gen.Virol. 5, 221 (1969).

Wadell, G.: Immunological relationships between hexons of certain human adenoviruses. J.Virol. 4, 663 (1969).

Rowe, W.P., Hartley, J.W., Huebner, R.J.: Serotype composition of the adenovirus group. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 97, 465 (1958).

Stevens, D.A., Schaeffer, M., Fox, J.P., Brandt, C.D., Romano, M.: Standardization and certification of reference antigens and antisera for 30 human adenovirus serotypes. Amer.J.Epid., 86, 617 (1967)

Wigand, R.: Serologische Beziehungen der Adenoviren der Gruppe II. Arch.ges.Virusforsch. 23, 40 (1968).

Wigand, R.: Adenoviruses types 20, 25 and 28: atypical members of group II. J.gen.Virol. 6, 325, (1970).

Wigand, R., Fliedner, D.: Serologically intermediate adenovirus strains: a regular feature of group II adenoviruses. Arch.ges.Virusforsch. 24, 245 (1968).

Wigand, R., Kasel, J.A., Alling, D.W., Knight, V.: Serological relationships between adenovirus haemagglutinins of group 2. Nature (Lond.) 207, 1207 (1965).

Wigand, R., Meiser, W.: Neutralization of adenoviruses by component antisera. Arch.ges.Virusforsch. 27, 112 (1969).

Tabelle 1: Zur Immunisierung verwendete Adenovirustypen (1. Immunisierung: Typ 24)
Heterologe Antikörperanstiege

Kan. Nr.	2. und 3. Immunisierung mit Typ	HA-Hemmung		Neutralisation	
		2. Imm.	3. Imm.	2. Imm.	3. Imm.
377	24, 24	-	-	-	-
394	24, 24	-	-	-	-
370	9, 20	-	10, 13	25	-
368	9, 25	-	9*, 10, 13, 27	-	-
302	15, 9	-	10, 15*	-	25
400	15, 20	33	13, 15*, 34	10	22
386	19, 9	-	10, 13	17, 26	-
395	19, 20	-	23	-	26
399	20, 9	13	-	-	-
378	20, 25	13	-	-	29
364	25, 20	-	-	17	29
397	25, -	33		10, 22	
366	28, 20	-	10	-	-

Kan. Nr.	2. und 3. Immunisierung mit Typ	HA-Hemmung		Neutralisation	
		2. Imm.	3. Imm.	2. Imm.	3. Imm.
369	28, 25	9	-	-	-
367	28, -	-		-	-
379	2, 5	-	-	-	-
384	2, 7	-	-	-	-
365	3, 7	-	-	-	-
385	3, 7	-	-	-	-
396	12, 18	-	-	-	-
398	12, 18	-	-	-	-
Zahl der Antikörper-anstiege		5	15	7	5

* Antikörperanstieg nach der 3. Immunisierung gegen den zur 2. Immunisierung verwendeten Typ.

Tabelle 2: Antikörper gegen Adenovirus Typ 24

Test	Serumentnahme *	377	394	370	368	302	400	386	395	399	378	364
N	1	40	20	40	40	40	40	40	80	40	40	40
	2	320	160	40	40	10	40	10	10	40	20	10
	3	320	320	25	40	5	10	10	10	20	5	10
HAH	1	640	80	320	640	140	320	40	320	320	160	200
	2	2560	1280	1280	2560	280	320	80	320	80	160	200
	3	2560	400	80	160	80	160	80	100	80	40	80

Test	Serumentnahme *	397	366	369	367	365	379	384	385	396	398
N	1	40	40	40	40	80	40	10	40	15	10
	2	40	40	40	40	40	40	10	10	10	10
	3	-	10	10	-	10	10	5	5	10	5
HAH	1	320	400	640	1280	320	640	320	80	160	80
	2	320	400	1280	1280	320	320	160	80	160	80
	3	-	80	400	-	640	100	80	40	80	40

* 1. Serumentnahme = 35 Tage nach der ersten Immunisierung
oder 2 Tage vor der zweiten Immunisierung
2. Serumentnahme = 15 Tage nach der zweiten Immunisierung
3. Serumentnahme = 15 Tage nach der dritten Immunisierung

Tabelle 3: Kreuzreaktion der heterologen HAH

Virus	24/24	24/24	9/20	9/25	15/9	15/20	19/9	19/20
Typ	377	394	370	368	302	400	386	395
9	* a –	–	160	<20	20	–	<20	–
	b –	–	80	80	40	–	160	–
10	–	–	<20	<20	<20	–	120	160
	–	–	80	40	80	–	1280	160
13	–	–	<20	<20	–	<20	<20	–
	–	–	160	40	–	640	40	–
15	–	–	–	–	40	320	–	–
	–	–	–	–	320	1280	–	–
19	–	–	–	–	–	–	640	800
	–	–	–	–	–	–	40	40
22	–	–	–	–	–	40	–	–
	–	–	–	–	–	60	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	<20
	–	–	–	–	–	–	–	80
27	–	–	–	<20	–	–	–	–
	–	–	–	40	–	20	–	–
29	–	–	–	<20	–	–	–	–
	–	–	–	40	–	–	–	–
33-15	–	–	–	–	–	200	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–
34-20	–	–	–	–	–	<20	–	–
	–	–	–	–	–	80	–	–
17, 26, 30	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–

- Fortsetzung -

Virus	20/9	20/25	25/20	25/-	28/20	28/25	28/-	Siehe im Text
Typ	399	378	364	397	366	369	367	6 andere Kaninch.
9	<20 160	- -	- -	-	- -	200 80	-	- -
10	- -	- -	- -	-	<20 40	- -	-	- -
13	200 -	60 40	- -	-	- -	- -	-	- -
15	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -
19	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -
22	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -
23	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -
27	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -
29	- -	- -	30 -	80 -	- -	- -	-	- -
33-15	- -	- -	- -	120 -	- -	- -	-	- -
34-20	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -
17, 26, 30	- -	- -	- -	-	- -	- -	-	- -

* - der Titer ist unter 20

a) die 2. Blutentnahme (nach der 2. Immunisierung)

b) die 3. Blutentnahme (nach der 3. Immunisierung)

☐ heterologe Antikörperanstiege

Tabelle 4: Heterologe Neutralisation

Virus	24/24	24/24	9/20	9/25	15/9	15/20	19/9	19/20
Typ	377	394	370	368	302	400	386	395
9	–	–	+	+	–	–	–	–
	–	–	+	+	+	–	+	–
10	–	–	–	–	+ *	[+]	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	+	+	–	–
	–	–	–	+	+	+	–	–
17	–	–	–	–	–	–	[+]	–
	–	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	+	+
	–	–	–	–	–	–	+	+
20	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	+	–	–	+	–	–
22	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	[+]	–	–
25	–	–	[+]	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	[+]	–	–	–
26	–	–	–	–	–	–	[+]	–
	–	–	–	–	–	–	–	[+]
28	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–
29	–	–	–	–	+	+	–	–
	–	–	–	–	+	+	–	–
13, 23, 27, 30, 24-32	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–

- Fortsetzung -

Virus	20/9	20/25	25/20	25/-	28/20	28/25	28/-
Typ	399	378	364	397	366	369	367
9	− +	− −	− −	−	− −	− −	−
10	− −	− −	− −	[+]	− −	− −	−
15	− −	− −	+ −	−	− −	− −	−
17	− −	− −	[+] −	−	− −	− −	−
19	− −	− −	− −	−	− −	− −	−
20	+ +	+ +	− +	−	− +	− −	−
22	− −	− −	− −	[+]	− −	− −	−
25	− −	− −	+ +	+	− −	− −	−
26	− −	− −	− −	−	− −	− −	−
28	− −	− −	− −	−	− −	− −	+
29	− −	− [+]	− [+]	−	− −	− −	−
13, 23 27, 30 24-32	− −	− −	− −	−	− −	− −	−

[.] unerwartete Antikörper

* unerwartete Antikörper im Präserum

Tabelle 5: Zahl der heterologen Antikörperanstiege gegen Viren der Untergruppe II [a]

Test	Immunisierung	Antikörper gegen	Immunisierung mit Typ 9, 15, 19	20, 25, 28	Typen außerhalb der Untergruppen II
HAH	2	Typ 24	3/6 [b]	1/7	0/6
	3		0/3	0/8	0/6
Neutr.	2	Typ 24	0/6	0/7	0/6
HAH	2	Untergruppe II [c]	1/84	4/98	0/84
	3		4/42	11/112	0/84
Neutr.	2	Untergruppe [c]	4/102	3/119	0/102
	3		1/51	4/136	0/102

[a] In den Tab. 1 und 5 wurden die Reaktionen ausgelassen, die auf Grund bekannter serologischer Beziehungen zwischen einzelnen Typen zu erwarten sind.

[b] Zähler: positive Reaktionen, Nenner: durchgeführte Teste.

[c] HA-Hemmung: 14 Typen außer Typ 24; Typ 8 und 9 als eines gezählt. Neutralisation:

Tabelle 6: Neutralisierende Antikörper gegen Typ 15, 25 und 29

Kan. Nr.	Immunisierung		Neutralisierende Antikörper gegen Typ		
	Nr.	mit Typ	15	25	29
302	2	15	+	-	+
400	2	15	+	-	+
364	2	25	+	+	-
397	2	25	-	+	-
368	3	25	+	+	-
369	3	25	-	-	-
378	3	25	-	-	+

Danksagung

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Wigand für die Überlassung des Themas verbindlichst danken; auch Herrn Dr. Shu möchte ich für seine Unterstüzung bei der Durchführung meiner Arbeit danken.

Ebenso bin ich Frl. D. Kuntze, Frl. Hermeling sehr verbunden für die mir erwiesene Hilfe.

Frau I. Maurer danke ich für die Herstellung der Gewebekulturen.

Die Untersuchungen sind Teile eines Forschungsprogrammes über Adenoviren, das von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt wird.

L e b e n s l a u f

Am 23. Mai 1947 wurde ich als Sohn der Eheleute Kho Jansiem in Pekalongan, Indonesien geboren.

Nach 6 jähriger Volksschulausbildung besuchte ich 6 Jahre lang das Gymnasium in Djakarta, wo ich 1965 das Abitur ablegte. Danach begann ich im Sommer 1966 mit dem medizinischen Studium an der Universität des Saarlandes. Im Wintersemester 1966/67 bestand ich das Vorphysikum und im Sommer 1968 das Physikum. An der Universität Homburg absolvierte ich auch die klinischen Semester. Im November 1971 legte ich mein Staatsexamen ab.